

目 录

简介	2
原理	2
试剂盒组成	3
保质期	3
准备工作	4
方案 1:干燥血斑 DNA 提取	5
方案 2:口香糖 DNA 提取	6
方案 3:其它法医样品 DNA 的提取	7
常见问题回答	8

版本: 2010-01

简介

HiPure Forensic DNA Kit 是专门为法医样品的 DNA 提取而设计。本试剂盒基于硅胶柱纯化技术，提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，也无需进行耗时的醇类沉淀，整个提取过程只需 30 分钟。得到的 DNA 可直接用于 PCR，病毒检测等实验。

原理

HiPure 硅胶柱是采用高结合力的玻璃纤维滤膜为基质。滤膜在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，可通过氢键和静电吸附核酸，而蛋白质或其它杂质不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液(如 Buffer TE)或水，洗脱出滤膜上吸附的核酸。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。

HiPure Forensic DNA Kit 基于硅胶柱纯化方式。样品在裂解液和蛋白酶作用下裂解消化，DNA 释放到裂解液中。加入乙醇后，转移至柱子中过滤，DNA 被吸附上柱子的膜上，而蛋白质则不被吸附而去除。柱子经 Buffer GW1 洗涤蛋白质和其它杂质，经 Buffer GW2 洗涤去除盐分，最后 DNA 被低盐缓冲液(10Mm Tris, pH8.5)洗脱。洗脱的 DNA 可直接用于 PCR、Southern blot、病毒检测等实验。

组 成

HiPure Forensic DNA Kit

产品编号	D3130-01	D3130-02	D3130-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure DNA Mini Columns I	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Buffer ATL	5 ml	30 ml	150ml
Buffer ACL	5 ml	30 ml	150ml
Buffer GW1 *	6.6 ml	13 ml	66 ml
Buffer GW2*	6 ml	20 ml	50 ml
Carrier RNA	120 µg	310 µg	3 x 310 µg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	15 ml
Proteinase K	6 mg	24 mg	120 mg
Elution Buffer	5 ml	15 ml	60 ml
说明书	1	1	1

保 质 期

本产品室温(15~25℃)可保存 18 个月。Proteinase K 干粉和 Carrier RNA 室温运输和保存，收到产品后，建议保存于-20~8℃。溶解后的 Proteinase K 和 Carrier RNA 需保存于-20~8℃。低温下，Buffer ATL 可能会有沉淀形成，需 55℃水浴让沉淀完全溶解。

需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)
- 无 DNase 酶的 1.5ml 离心管和无 DNase 酶的枪头
- (可选) 一管 50mg/ml RNase A 溶液
- 小型离心管(<12,000 xg)
- 55°C 和 65°C 的水浴锅
- 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入 Protease Dissolve Buffer 溶解 Proteinase K 至终浓度为 20mg/ml。Proteinase K 干粉在 2-8°C 保存一年, 但溶解的 Proteinase K 须分装保存于-20°C。反复冻溶 Proteinase K 会影响其活性。冻藏保存过程中, Proteinase K 才能有沉淀析出, 可在 37°C 水浴 0.5-1 分钟让沉淀消失。
- 溶解 Carrier RNA(1µg/µl): 加入适量的 Elution Buffer 至 Carrier RNA。涡旋溶解, 保存于-20°C。
- 用无水乙醇稀释 Buffer GW1, 并于室温保存。

D3130-01	加入 8.4 ml 无水乙醇
D3130-02	加入 17 ml 无水乙醇
D3130-03	每瓶中加入 84 ml 无水乙醇

- 用无水乙醇稀释 Buffer GW2, 并于室温保存。

D3130-01	加入 24 ml 无水乙醇
D3130-02	加入 80 ml 无水乙醇
D3130-03	每瓶中加入 200 ml 无水乙醇

方案 1. 滤纸血斑 DNA 提取

该方案适合于从干燥的血斑样品中提取 DNA，包括基因组 DNA，线粒体 DNA 以及病毒 DNA。

1. 用打孔器从收集卡上取下 3 块直径为 3mm 的血斑样品，并转移至 1.5ml 离心管中。
2. **加入 200 μ l Buffer ATL 和 20 μ l Proteinase K 至样品中。**混匀，55 $^{\circ}$ C 高速振荡 30~60 分钟。
3. **加入 200 μ l Buffer ACL 至样品中。**混匀，60 $^{\circ}$ C 高速振荡 15 分钟。
4. **转移消化液至新的离心管中，加入 200 μ l 无水乙醇至样品中。**涡旋混匀 10 秒。短暂离心收集管壁上的液滴。
5. 把 DNA 柱装在收集管中。**转移混合液至柱子中。**8,000 \times g 离心 60 秒。
6. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer GW1(已用乙醇稀释) 至柱子上。**8,000 \times g 离心 30-60 秒。
7. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。**加入 600 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释) 至柱子中，**8,000 \times g 离心 30-60 秒。
8. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。10,000 \times g 离心空柱 3 分钟，以甩干柱子的基质；这一步可彻底去除柱子中残留的乙醇。
9. **将柱子转移至新的 1.5ml 离心管。加入 20-30 μ l Elution Buffer 至柱子的膜中央。**室温放置 3 分钟。8,000 \times g 离心 1 分钟。
10. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存 2-8 $^{\circ}$ C，长期保存需保存于-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C。

方案 2:口香糖 DNA 抽提

该方案适合从口香糖中提取 DNA。

1. 取 30mg 口香糖，并切片小碎片后转移拭子至 1.5ml 离心管中。
2. **加入 300 μ l Buffer ATL 和 20 μ l Proteinase K 至样品中。**混匀，55 $^{\circ}$ C 水浴 3 小时，水浴期间每隔 20 分钟涡旋混匀一次。
3. **加入 300 μ l Buffer ACL 至样品中。**涡旋混匀 30 秒，60 $^{\circ}$ C 水浴 1 小时。水浴期间每隔 20 分钟涡旋混匀一次。
4. 加入 150 μ l 无水乙醇，涡旋 15 秒混匀。
5. 14,000 \times g 离心 5 分钟。
6. 把 DNA 柱装在收集管中。**转移上清液至柱子中。**8,000 \times g 离心 60 秒。
7. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子上。**8,000 \times g 离心 30-60 秒。
8. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。**加入 650 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中，**8,000 \times g 离心 30-60 秒。
9. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。**加入 350 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**10,000 \times g 离心空柱 2 分钟，以甩干柱子的基质；这一步可彻底去除柱子中残留的乙醇。
10. **将柱子转移至新的 1.5ml 离心管。加入 30-100 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Elution Buffer 至柱子的膜中央。**室温放置 3 分钟。8,000 \times g 离心 1 分钟。
注：DNA 柱子最小洗脱体积是 30 μ l，小于 30 μ l 会导致洗脱效率下降。第一次洗脱可洗脱出 60-70% DNA，若需获得最高产量，可再加入 30-100 μ l Elution Buffer 至柱子的膜中央。室温放置 3 分钟。8,000 \times g 离心 1 分钟进行第二次洗脱。

方案 3：从其它法医样品提取 DNA

1. 样品的预处理：

- **香烟头 DNA 的提取：**取烟头滤嘴最末端处，剪取下 1cm² 的包在滤嘴上的纸片。把纸片剪切成 6 小块并转移至 1.5ml 离心管中。加入 300~500 μ l Buffer ATL 和 20 μ l Proteinase K，涡旋混匀。按第二步进行操作。
 - **邮票和信纸 DNA 的提取：**从邮票和信纸中剪取 0.5-2.5cm² 纸片样品。把样品剪成小片并转移至 1.5ml 离心管中。加入 300~500 μ l Buffer ATL 和 20 μ l Proteinase K，涡旋混匀。按第二步进行操作。
 - **带发根的头发的 DNA 提取：**从发根处剪取 0.5-1cm 的头发并转移至 1.5ml 离心管中。加入 300 μ l Buffer ATL、20 μ l 1M DTT 和 20 μ l Proteinase K，涡旋混匀。按第二步进行操作。
 - **不带发根的头发的 DNA 提取：**剪取 0.5-1cm 的头发并转移至 1.5ml 离心管中。加入 300 μ l Buffer ATL、20 μ l 1M DTT 和 20 μ l Proteinase K，涡旋混匀。按第二步进行操作。
 - **指甲 DNA 的提取：**转移指甲碎片至 1.5ml 离心管中。加入 300 μ l Buffer ATL、20 μ l 1M DTT 和 20 μ l Proteinase K，涡旋混匀。按第二步进行操作。
 - **从染有血液、唾液及精液的材料中提取 DNA：**剪取 0.5 cm² 的染有血液、唾液及精液的材料，并剪成小碎片后，转移至 1.5ml 离心管中。加入 300~500 μ l Buffer ATL、20 μ l 1M DTT 和 20 μ l Proteinase K，涡旋混匀。按第二步进行操作。
 - **骨头 DNA 提取：**将骨头研磨成粉末，取 30~100mg 粉末至 1.5ml 离心管中，加入 300~500 μ l Buffer ATL、20 μ l 1M DTT 和 20 μ l Proteinase K，涡旋混匀。按第二步进行操作。
2. 56 $^{\circ}$ C 振荡水浴 1-6 小时或过夜。
 3. 10,000 \times g 离心 3 分钟。
 4. 转移 300 μ l 上清液至 1.5ml 离心管中，加入 300 μ l Buffer ACL 和 150 μ l 异丙醇，涡旋混匀。
 5. 把 DNA 柱装在收集管中。**转移混合液至柱子中。**8,000 \times g 离心 60 秒。
 6. 倒弃滤液把柱子装回收集管。**加入 500 μ l Buffer GW1。**8,000 \times g 离心 30-60 秒。

7. 倒弃滤液把柱子装回收集管。加入 650 μ l Buffer GW2。8,000 \times g 离心 30-60 秒。
8. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管。加入 30-100 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Elution Buffer 至柱子的膜中央。室温放置 3 分钟。8,000 \times g 离心 1 分钟。

常见问题解答

该列表可能有利于您解决在提取过程中所碰到的问题。此外，Magen 的技术人员也可以随时为您提供咨询服务，若您对试剂盒存在疑问或有良好的建议，又或者您在分子生物学实验中碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽所能为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
柱子堵塞	
样品不充分打散或匀浆	<ul style="list-style-type: none"> ● 参照样品的打散及匀浆，提高样品的裂解效果； ● 提高离心速度和时间； ● 减少样品的用量或增加裂解液 ATL 的用量和延长匀浆时间；
样品起始用量太多 裂解液加入乙醇之前，需要离心	减少样品用量。正确的样品用量是获得理想结果的必要条件；裂解液在加入乙醇之前需要离心去除不溶的杂质。沉淀中含有细胞碎片会引起柱子的堵塞。处理某些组织样品时，离心后裂解液表面还可能会有一层脂类层，转移上清液尽量不要吸到这些物质。
低温离心	试剂盒中除特别指明，所有的离心操作都必须在室温（20-25 $^{\circ}$ C）。离心条件低于 20 $^{\circ}$ C 时，可能会导致沉淀的形成而引起柱子堵塞。设定离心机的温度为（20-25 $^{\circ}$ C）。上柱时，把裂解液和乙醇混合液放置于 37 $^{\circ}$ C 水浴有利于减少堵塞现象。
下游实验结果不理想	
盐分污染	加入 Buffer GW2 后，静置 5 分钟后，再离心
乙醇污染	确保空柱离心速度高于或等于 12,000 \times g，离心时间为 2 分钟。
膜材料脱落	硅胶膜在离心过程中可能会发生脱落。脱落到质粒中硅胶膜是不溶解的，可能过 12,000 \times g 离心 2 分钟去除。